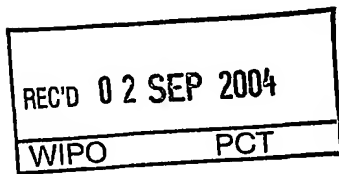


06.08.2004



**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 10 2004 028 859.3  
**Anmeldetag:** 15. Juni 2004  
**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE  
**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von L-Threonin  
**Priorität:** 01. August 2003 DE 103 35 253.8  
11. Mai 2004 DE 10 2004 023 055.2  
**IPC:** C 12 P, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 29. Juli 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**Stremme**

### Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

Gegenstand der Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae.

#### 5 Stand der Technik

L-Threonin findet in der Tierernährung, in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Threonin durch Fermentation von Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli hergestellt werden kann. Wegen der großen Bedeutung dieser Aminosäure wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet.

Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, 15 oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen, d.h. die genetisch bedingten Leistungseigenschaften des 20 Mikroorganismus selbst betreffen.

Es ist bekannt, dass Threonin durch Fermentation von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli, im Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) hergestellt werden kann. Im 25 Satzverfahren werden alle Nährstoffe direkt zu Beginn der Fermentation vorgelegt. Im Zulaufverfahren wird ein Zusatz-Nährmedium der Kultur zugeführt. Dieser Zulauf kann direkt zu Beginn der Kultivierung oder nach Ablauf einer bestimmten Kultivierungszeit starten, beispielsweise dann, 30 wenn eine mit dem vorgelegten ersten Nährmedium eingebrachte Komponente verbraucht worden ist. Bei Fermentationsende wird der komplette Inhalt des Fermenters geerntet und das in der Fermentationsbrühe enthaltene

Threonin isoliert und gereinigt oder anderweitig  
verarbeitet. Dieser Prozess ist beispielsweise in den  
Patentschriften US 5,538,873, EP-B-0593792, WO 01/4525 und  
bei Okamoto et al. (Bioscience, Biotechnology, and  
5 Biochemistry 61 (11), 1877 - 1882, 1997) beschrieben.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Threonin unter  
Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae,  
insbesondere Escherichia coli, ist in der Patentschrift US  
6,562,601 beschrieben. Es besteht darin, dass das Bakterium  
10 zunächst nach dem Zulaufverfahren kultiviert wird, wobei  
sich Threonin in der Fermentationsbrühe anreichert. Zu  
einem gewünschten Zeitpunkt wird ein Teil, d.h. 10 bis 99%  
der im Fermenter enthaltenen Fermentationsbrühe geerntet.  
Der restliche Teil der Fermentationsbrühe verbleibt im  
15 Fermenter. Die im Fermentierbehälter verbleibende  
Fermentationsbrühe wird mit Nährmedium aufgefüllt und eine  
weitere Fermentation nach dem Zulaufverfahren durchgeführt.  
Der beschriebene Zyklus wird gegebenenfalls mehrfach  
durchgeführt..

## 20 Aufgabe der Erfindung

Es war Aufgabe dieser Erfindung, neue Maßnahmen zur  
verbesserten fermentativen Herstellung von L-Threonin  
bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

25 Gegenstand der Erfindung ist ein Fermentationsverfahren,  
das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- a) ein L-Threonin produzierendes Bakterium der Familie  
Enterobacteriaceae in mindestens einem ersten  
Nährmedium inokuliert und kultiviert,
- 30 b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium  
oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder  
mehreren Zufütterungsströmen der Kultur

kontinuierlich zuführt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, unter Bedingungen, die die Bildung von L-Threonin erlauben, und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen, wobei

- c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während der kontinuierlichen Kultivierung bei maximal 30 g/l eingestellt wird.

Erfindungsgemäß kann die Anlagenleistung eines L-Threonin produzierenden Fermenters dadurch gesteigert werden, dass man in dem oben beschriebenen ersten Schritt a) nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert, wobei bei Verwendung des Zulaufverfahrens mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird. In dem beschriebenen anschließenden Schritt b) werden mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zugeführt und gleichzeitig wird der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnommen, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen.

Unter dem Begriff Anlagenleistung versteht man, dass in einer Anlage (plant) wie z. B. einem Fermenter die Masse bzw. Menge eines Produktes z. B. L-Threonin mit einer bestimmten Ausbeute und mit einer bestimmten Geschwindigkeit bzw. Produktivität oder Raum-Zeit-Ausbeute hergestellt wird. Diese Parameter bestimmen weitgehend die Kosten bzw. die Wirtschaftlichkeit eines Verfahrens.

Unter einer Kulturbrühe versteht man die durch die Kultivierung eines Mikroorganismus - im Falle der vorliegenden Erfindung ein L-Threonin produzierendes Bakterium - in einem Nährmedium unter Verwendung eines Fermenters oder Kulturgefäßes entstandene Suspension eines Mikroorganismus.

Während des Schrittes a) wird das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) kultiviert. Bei Verwendung des Zulaufverfahrens wird nach mehr als 0 bis maximal 10 Stunden, vorzugsweise nach 1 bis 10 Stunden, bevorzugt nach 2 bis 10 Stunden und besonders bevorzugt nach 3 bis 7 Stunden ein Zusatz-Nährmedium zugeführt.

Das erste Nährmedium enthält als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 1 bis 100 g/kg oder 1 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 45 g/kg, besonders bevorzugt von 20 bis 40 g/kg. Unter Stärkehydrolysat versteht man erfindungsgemäß das Hydrolysat von Stärke aus Mais, Getreide, Kartoffeln oder Tapioka.

Als Stickstoffquelle im erste Nährmedium können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat Kaliumnitrat, Kaliumnatriumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 1 bis 40 g/kg, bevorzugt von 10 bis 30 g/kg, besonders bevorzugt von 10 bis 25 g/kg, ganz

besonders bevorzugt 1 bis 30 g/kg oder 1 bis 25 g/kg verwendet werden.

Als Phosphorquelle im ersten Nährmedium können Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der

- 5 Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natriumhaltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits, auch Phytinsäure genannt oder deren Alkali- oder Erdalkalisalze, in den
- 10 Konzentrationen von 0,1 bis 5 g/kg, bevorzugt von 0,3 bis 3 g/kg, besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,5 g/kg verwendet werden. Das erste Nährmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Diese
- 15 Substanzen liegen in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg vor. Schließlich werden essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie
- 20 z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

Das Zusatz-Nährmedium, welches in einem Zulaufverfahren (fed batch) angewandt wird, enthält im Allgemeinen lediglich als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse

25 aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 300 bis 700 g/kg, bevorzugt von 400 bis 650 g/kg, und gegebenenfalls eine

30 anorganische Stickstoffquelle wie z.B. Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Alternativ können diese und andere Komponenten auch separat zugefüttert werden.

Es wurde gefunden, dass bei der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b) die Bestandteile des weiteren Nährmediums in Form eines einzigen weiteren Nährmediums sowie in einer Vielzahl von weiteren Nährmedien der Kultur  
5 zugeführt werden können. Erfindungsgemäß wird das weitere Nährmedium beziehungsweise werden die weiteren Nährmedien in mindestens einem (1) Zufütterungsstrom oder in einer Vielzahl an Zufütterungsströmen mindestens 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 7 oder 2 bis 5 Zufütterungsströmen der  
10 Kultur zugeführt.

Der Begriff „kontinuierlich“ bedeutet, dass der Zufütterungsstrom bzw. die Zufütterungsströme im wesentlichen ununterbrochen, das heißt mit höchstens kurzen, einzelnen Pausen der Kultur hinzugefügt  
15 wird/werden. Die einzelnen Unterbrechungen oder Pausen betragen bis zu maximal 0,5, 1, 2 oder 3 Stunden. Die Summe der einzelnen Unterbrechungen bzw. Pausen bei der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b) beträgt maximal 10%, 8%, 6%, 4%, 2% oder 1% der Gesamtzeit der  
20 kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b).

Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien enthält/enthalten als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose,  
25 Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 20 bis 700 g/kg, bevorzugt von 50 bis 650 g/kg.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die  
30 weiteren Nährmedien eine Stickstoffquelle bestehend aus organischen, Stickstoff-haltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid,  
35 Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat und/oder

Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 5 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 40 g/kg, verwendet werden.

- 5 Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Phosphorquelle bestehend aus Phosphorsäure oder den Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-
- 10 haltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits, auch Phytinsäure genannt bzw. die entsprechenden Alkali- oder Erdalkalisalze. Die Phosphorquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 0,3 bis 3 g/kg, bevorzugt von 0,5 bis 2 g/kg verwendet werden. Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien muss/müssen
- 15 weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind, in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg, bevorzugt in den Konzentrationen von 0,008 bis 2 g/kg. Schließlich werden essentielle Wachsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

- Bei Verwendung eines einzigen weiteren Nährmediums wird dieses typischerweise in einem Zufütterungsstrom der Kultur zugeführt. Bei Verwendung einer Vielzahl weiterer Nährmedien werden diese in einer entsprechenden Vielzahl an
- 30 Zufütterungsströmen zugeführt. Bei der Verwendung einer Vielzahl weiterer Nährmedien ist zu beachten, dass diese jeweils nur eine der beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen enthalten können, aber auch eine Mischung von den beschriebenen Kohlenstoff-,
- 35 Stickstoff-, oder Phosphorquellen.



Erfindungsgemäß wird das zugeführte weitere Nährmedium oder die zugeführten weiteren Nährmedien so eingestellt, das ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 mmol Phosphor / mol Kohlenstoff besteht.

Der Zufütterungsstrom oder die Summe der Zufütterungsströme in dem erfindungsgemäßen Verfahren werden mit einer Geschwindigkeit entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner als 30 Stunden, bevorzugt kleiner als 25, ganz besonders bevorzugt kleiner als 20 Stunden hinzugeführt. Dabei ist die mittlere Verweilzeit (residence time) die theoretische Zeit, die Teilchen in einer kontinuierlich betriebenen Kultur verbleiben. Die mittlere Verweilzeit wird beschrieben durch das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens des Reaktors und der Durchflussmenge (Biotechnologie, H. Weide, J. Páca und W. A. Knorre, Gustav Fischer Verlag Jena, 1991).

Starkes Wachstum zu Beginn der Kultivierung gemäß Schritt (a) ist normalerweise eine logarithmische Wachstumsphase. Der logarithmischen Wachstumsphase folgt im Allgemeinen eine Phase von geringerem Zellwachstum als in der logarithmischen Phase.

Beginnt das erfindungsgemäße Verfahren in Schritt a) mit einem Satzverfahren so wird/werden nach > (größer) 0 bis 20 Stunden, 1 bis 20 Stunden, nach 1 bis 10 Stunden, 2 bis 10 Stunden oder 3 bis 7 Stunden bezogen auf den Beginn des Satzverfahrens ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt. Der Beginn der Entnahme der Kulturbrühe mit einem oder mehreren Entnahmestromen erfolgt mit dem Beginn der Zuführung des weiteren Nährmediums bzw. der weiteren Nährmedien oder zeitlich versetzt, d.h. vor oder

nach Beginn der Zuführung des weiteren Nährmediums oder der weiteren Nährmedien. Falls der Beginn der Zufütterung und der Beginn der Entnahme zeitlich versetzt erfolgen, beträgt die entsprechende Zeitdifferenz im Allgemeinen maximal 5  
5 Stunden, 3 Stunden, 2 Stunden oder 1 Stunde.

Beginnt das erfindungsgemäße Verfahren in Schritt a) mit einem Zulaufverfahren so wird/werden nach > (größer) 0 bis 80 Stunden, 1 bis 80 Stunden, nach 1 bis 60 Stunden, 5 bis 50 Stunden, 6 bis 45 Stunden, oder 8 bis 40 Stunden bezogen  
10 auf den Beginn des Zulaufverfahren ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt. Der Beginn der Entnahme der Kulturbrühe mit einem oder mehreren Entnahmestromen erfolgt mit dem Beginn der Zuführung des  
15 weiteren Nährmediums bzw. der weiteren Nährmedien oder zeitlich versetzt, d.h. vor oder nach Beginn der Zuführung des weiteren Nährmediums. Falls der Beginn der Zufütterung und der Beginn der Entnahme zeitlich versetzt erfolgen, beträgt die entsprechende Zeitdifferenz im Allgemeinen  
20 maximal 5 Stunden, maximal 3 Stunden, maximal 2 Stunden oder maximal 1 Stunde.

Nach > (größer) 0 bis 100 Stunden, 1 bis 85 Stunden, 2 bis 80 Stunden, 3 bis 75 Stunden, 5 bis 72 Stunden, 10 bis 72 Stunden, 10 bis 60 Stunden, oder 15 bis 48 Stunden bezogen  
25 auf den Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens gemäß Schritt (a) entspricht der Entnahmestrom oder die Summe der Entnahmeströme im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme und der Zustand der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b) des  
30 erfindungsgemäßen Verfahrens ist erreicht. Im wesentlichen bedeutet hier, dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% oder 95% - 105% des Zufütterungsstroms oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht. Die Entnahme kann durch

Abpumpen und oder durch Ablassen der Kulturbrühe technisch realisiert werden.

Erfindungsgemäß wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle mindestens während der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt (b) im Allgemeinen bei maximal 30 g/l, maximal 20 g/l, maximal 10 g/l, bevorzugt bei maximal 5 g/l, besonders bevorzugt maximal 2 g/l eingestellt. Diese Konzentration wird mindestens während 75%, bevorzugt mindestens während 85%, besonders bevorzugt mindestens während 95% der Zeit der Kultivierung gemäß Schritt (b) aufrechterhalten. Dabei wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle anhand von Methoden bestimmt, die Stand der Technik sind.  $\beta$ -D-Glukose wird z.B. in einem Glukoseanalysator YSI 02700 Select der Firma Yellow Springs Instruments (Yellow Springs, Ohio, USA) bestimmt.

Gegebenenfalls kann die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen werden bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l, unter 1 g/l oder unter 0,5 g/l sinkt.

In einem erfindungsgemäßen Verfahren beträgt die Ausbeute mindestens 31 %, mindestens 33 %, mindestens 35 %, mindestens 37 %, mindestens 38 %, mindestens 40 %, mindestens 42 %, mindestens 44 %, mindestens 46 % oder mindestens 48 %. Dabei ist die Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Menge an L-Threonin zu der Gesamtmenge der eingesetzten oder verbrauchten Kohlenstoffquelle.

In einem erfindungsgemäßen Verfahren wird L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,5 g/l pro Std., von mindestens 2,5 bis 3,5 g/l pro Std., von mindestens 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std., oder von mindestens 5,0 bis 8,0 g/l oder mehr pro Std. gebildet. Dabei ist die Raum-Zeit-

Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Threoninmenge zu dem Volumen der Kultur über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gesehen. Die Raum-Zeit-Ausbeute wird auch volumetrische Produktivität genannt.

Naturgemäß wird bei einem Fermentationsverfahren wie dem erfindungsgemäßen das Produkt mit einer bestimmten Ausbeute und mit einer bestimmten Raum-Zeit-Ausbeute (volumetrische Produktivität) hergestellt. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann L-Threonin mit einer Ausbeute von mindestens 31 Gew.-% und einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,5 g/l pro Std. hergestellt werden. Weitere Kopplungen von Ausbeute mit Raum-Zeit-Ausbeute wie beispielsweise eine Ausbeute von mindestens 37 % und eine Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro. Std. ergeben sich zwanglos aus den obigen Ausführungen.

Während der Kultivierung wird die Temperatur in einem Bereich von 29 bis 42°C, vorzugsweise von 33 bis 40°C, eingestellt. Die Kultivierung kann bei Normaldruck oder gegebenenfalls bei Überdruck, vorzugsweise bei 0 bis 1,5 bar Überdruck durchgeführt werden. Der Sauerstoffpartialdruck wird auf 5 bis 50%, vorzugsweise ca. 20%, Luftsättigung geregelt. Dabei wird die Kultur gerührt und mit Sauerstoff versorgt. Die Regelung des pH-Wertes auf pH ca. 6 bis 8, vorzugsweise 6,5 bis 7,5 kann mit 25%igem Ammoniakwasser erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird mindestens ca. 72 Stunden vorzugsweise 100 bis  $\geq 300$ , besonders bevorzugt 200 bis  $\geq 300$  Stunden betrieben. Im erfindungsgemäßen Verfahren wird das Volumen der Kultur mindestens ein halbes Mal, mindestens 1 Mal, mindestens 2 Mal, mindestens 3 Mal, mindestens 4 Mal, mindestens 6 Mal, mindestens 8 Mal, mindestens 10 Mal, mindestens 12 Mal ausgetauscht.

Aus der entnommenen Kulturbrühe kann das L-Threonin gewonnen, gesammelt oder konzentriert und gegebenenfalls gereinigt werden.

Es ist ebenfalls möglich aus der entnommenen Kulturbrühe (= Fermentationsbrühe) ein Produkt herzustellen, indem man die in der Kulturbrühe enthaltene Biomasse des Bakteriums vollständig (100%) oder nahezu vollständig d.h. mehr als oder größer als (>) 90%, >95%, >97%, >99% entfernt und die übrigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend d.h. zu 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100%, oder 90% - 100%, bevorzugt größer gleich ( $\geq$ ) 50%,  $\geq$ 60%,  $\geq$ 70%,  $\geq$ 80%,  $\geq$ 90% oder  $\geq$ 95% oder auch vollständig (100%) im Produkt belässt.

Zur Entfernung oder Abtrennung der Biomasse werden Separationsmethoden wie beispielsweise Zentrifugation, Filtration, Dekantieren, Flockung oder eine Kombination hieraus eingesetzt.

Die erhaltene Brühe wird anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, durch Nanofiltration oder einer Kombination hieraus eingedickt beziehungsweise konzentriert.

Diese aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet. Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulierungsverfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Das Wasser wird hierbei insgesamt zu mehr als 90% entfernt, sodass der Wassergehalt im Produkt kleiner als 10%, kleiner als 5% beträgt.

Die angegebenen Verfahrensschritte müssen nicht notwendigerweise in der hier aufgeführten Reihenfolge durchgeführt sondern können gegebenenfalls in technisch sinnvoller Weise kombiniert werden.

- 5 Die Analyse von L-Threonin und anderen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC  
10 erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind L-Threonin produzierende Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen

- 15 Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia geeignet. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

- 20 Die Bakterien enthalten mindestens eine Kopie eines thrA-Gens oder Allels, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auch von „feed back“ resistenten oder auch von desensibilisierten Varianten  
25 gesprochen. Derartige Bakterien sind typischerweise resistent gegen das Threoninanalogon  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure (AHV) (Shiio und Nakamori, Agricultural and Biological Chemistry 33 (8), 1152-1160 (1969)). Biochemische Untersuchungen zu „feed back“  
30 resistenten Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten sind beispielsweise bei Cohen et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications 19(4), 546-550 (1965)) und bei Omori et al. (Journal of Bacteriology 175(3), 785-794 (1993)) beschrieben. Gegebenenfalls wird

die Threonin-insensitive Aspartatkinase I -  
Homoserindehydrogenase I überexprimiert.

Methoden der Überexpression sind im Stand der Technik  
hinlänglich - beispielsweise bei Makrides et al.

- 5 (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1996)) -  
beschrieben. Durch Verwendung von Vektoren wird die  
Kopienzahl um mindestens eine (1) Kopie erhöht. Als  
Vektoren können Plasmide wie beispielsweise in der US  
5,538,873 beschrieben verwendet werden. Als Vektoren können  
10 ebenfalls Phagen, beispielsweise der Phage Mu, wie in der  
EP 0 332 448 beschrieben, oder der Phage lambda ( $\lambda$ )  
verwendet werden. Eine Erhöhung der Kopienzahl kann auch  
dadurch erzielt werden, dass eine weitere Kopie in eine  
weitere Stelle des Chromosoms - beispielsweise in die att-  
15 site des Phagen  $\lambda$  (Yu und Court, Gene 223, 77-81 (1998)) -  
eingebaut wird. In der US 5,939,307 wird beschrieben, dass  
durch Einbau von Expressionskassetten oder Promotoren wie  
beispielsweise tac-Promotor, trp-Promotor, lpp-Promotor  
oder  $P_L$ -Promotor und  $P_R$ -Promotor des Phagen  $\lambda$  stromaufwärts  
20 des chromosomalen Threoninoperons eine Erhöhung der  
Expression erzielt werden konnte. In gleicher Weise können  
die Promotoren des Phagen T7, die gear-box-Promotoren oder  
der nar-Promotor verwendet werden. Derartige  
Expressionskassetten oder Promotoren können auch verwendet  
werden um, wie in der EP 0 593 792 beschrieben,  
plasmidgebundene Gene zu überexprimieren. Durch Verwendung  
des  $lacI^Q$ -Allels lässt sich wiederum die Expression  
plasmidgebundener Gene kontrollieren (Glascock und  
Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)). Durch Entfernung des  
30 Attenuators des Threonin-Operons (Park et al.,  
Biotechnology Letters 24, 1815-1819 (2002)) oder durch  
Verwendung der thr79-20 Mutation (Gardner, Proceedings of  
the National Academy of Sciences, USA 76(4), 1706-1710  
(1979)) oder durch Mutation des für die Threonyl-t-RNA-  
35 Synthetase kodierenden thrS-Gens wie bei Johnson et al.  
(Journal of Bacteriology 129(1), 66-70 (1977) beschrieben

kann ebenfalls eine Überexpression erzielt werden. Durch die beschriebenen Maßnahmen wird die intrazelluläre Konzentration der jeweiligen Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Proteinvariante um mindestens 10% im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöht.

Ein geeignetes thrA-Allel ist in der US 4,278,765 beschrieben und in Form des Stammes MG442 bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) unter der Zugangsnummer CMIM B-1628 erhältlich. Andere geeignete thrA-Allele sind in der WO 00/09660 und WO 00/09661 beschrieben und bei dem Korean Culture Centre of Microorganisms (KCCM, Seoul, Korea) unter den Zugangsnummern KCCM 10132 und KCCM 10133 erhältlich. Ein weiteres geeignetes thrA-Allel ist in dem Stamm H-4581 vorhanden, der in der US 4,996,147 beschrieben und unter der Zugangsnummer Ferm BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japan) erhältlich ist. Schließlich sind weitere thrA-Allele in der US 3,580,810 beschrieben, welche in Form der bei der ATCC hinterlegten Stämme ATCC 21277 und ATCC 21278 erhältlich sind. Ein weiteres Allel ist in der US 3,622,453 beschrieben und in Form des Stammes KY8284 unter der Zugangsnummer ATCC 21272 bei der ATCC erhältlich. Darüber hinaus ist in der WO 02/064808 ein weiteres thrA-Allel beschrieben und in Form von Stamm pGmTN-PPC12 unter der Zugangsnummer KCCM 10236 bei der KCCM hinterlegt.

Gegebenenfalls können thrA-Allele, die für „feed back“ resistente Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, mit den hinlänglich bekannten Methoden der konventionellen Mutagenese von Zellen unter Verwendung von mutagenen Stoffen beispielsweise N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin (MNNG) oder Ethylmethansulfonat (EMS) oder mutagenen Strahlen beispielsweise UV-Strahlen und anschließender Selektion von Threoninanaloga



(beispielsweise AHV) resistenten Varianten isoliert werden. Derartige Mutagenesemethoden sind beispielsweise bei Shio und Nakamori (Agricultural and Biological Chemistry 33 (8), 1152-1160 (1969)) oder bei Saint-Girons und Margerita

5 (Molecular and General Genetics 162, 101-107 (1978)) oder in dem bekannten Handbuch von J. H. Miller (A Short Course In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1992) insbesondere auf den  
10 Seiten 135 bis 156 beschrieben. Shio und Nakamori

behandeln beispielsweise eine Zellsuspension von Escherichia coli für ca. 15 Minuten mit 0,5 mg/ml MNNG in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer von pH 7 bei

Raumtemperatur (d. h. im Allgemeinen ca. 16 bis 26°C) zur  
15 Erzeugung von Mutationen. Miller empfiehlt beispielsweise eine Behandlung für 5 bis 60 Minuten mit 30 µl EMS pro 2 ml Zellsuspension in 0,1 M TRIS-Puffer bei pH 7,5 bei einer Temperatur von 37°C. Diese Mutagenesebedingungen können in naheliegender Weise abgeändert werden. Die Selektion von

20 AHV-resistenten Mutanten erfolgt auf Minimalagar, der typischerweise 2 bis 10 mM AHV enthält. Die entsprechenden Allele können anschließend kloniert und einer

Sequenzbestimmung und die von diesen Allelen kodierten Proteinvarianten einer Aktivitätsbestimmung unterzogen  
5 werden. Gegebenenfalls können die erzeugten Mutanten auch direkt verwendet werden. Das Wort „direkt“ bedeutet, dass die erzeugte Mutante für die Herstellung von L-Threonin in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann oder dass an dieser Mutante weitere Veränderungen zur

30 Erhöhung der Leistungseigenschaften, wie beispielsweise Abschwächung des Threoninabbaus oder Überexpression des Threoninoperons durchgeführt werden können.

---

In gleicher Weise können auch Methoden der in-vitro  
Mutagenese verwendet werden wie sie beispielsweise in dem  
35 bekannten Handbuch von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989) beschrieben sind. Entsprechende Methoden sind auch kommerziell in Form sogenannter „kits“ wie beispielsweise der von Papworth et al. (Strategies 9(3), 3-4 (1996)) beschriebene „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verfügbar.

Diese Mutagenesemethoden können naturgemäß auch auf andere Gene, Allele oder Stämme beziehungsweise Fragestellungen und Aufgaben, wie beispielsweise der Erzeugung und Isolierung von Mutanten, die gegenüber L-Threonin resistent sind, angewendet werden.

Bevorzugt werden solche thrA-Allele, die für Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, die in Gegenwart von 10 mM L-Threonin mindestens 40%, mindestens 45%, mindestens 50%, mindestens 55% oder mindestens 60%, der Homoserin-Dehydrogenase Aktivität und/oder die in Gegenwart von 1 mM L-Threonin mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 75% oder mindestens 80%, der Homoserin-Dehydrogenase Aktivität im Vergleich zur Aktivität in Abwesenheit von L-Threonin aufweisen. Gegebenenfalls beträgt die Aspartatkinase-Aktivität der genannten Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten in Gegenwart von 10 mM L-Threonin mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75% bis oder mindestens 80% der Aktivität in Abwesenheit von L-Threonin.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthalten. Die amber-Mutation liegt vorzugsweise an der Position 33 entsprechend der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes. Als amber-Suppressor wird vorzugsweise supE eingesetzt. Diese Bakterien sind in PCT/EP02/02055 beschrieben. Ein

Stamm, der die beschriebene Mutation im rpoS-Gen und den Suppressor supE enthält, ist unter der Zugangsnummer DSM 15189 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) erhältlich.

- 5 Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens kann dem Stand der Technik entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens entsprechend der Accession No. AE000358 ist als SEQ ID NO. 1 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des dazugehörigen RpoS-Genproduktes bzw. Proteins ist in der SEQ ID NO. 2  
10 dargestellt. Die Nukleotidsequenz eines rpoS-Allels, das ein Stopkodon vom Typ amber an der Stelle der Nukleotidsequenz entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes bzw. Proteins, entsprechend SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID NO. 2, enthält, ist  
15 in SEQ ID NO. 3 wiedergegeben. Der Suppressor supE ist im Stand der Technik beschrieben und als SEQ ID NO. 4 dargestellt.

- Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die nicht in der Lage sind  
20 unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen bzw. als Stickstoffquelle zu verwerten. Unter aeroben Kulturbedingungen versteht man solche, bei denen der Sauerstoffpartialdruck in der Fermentationskultur während 90%, bevorzugt 95%, ganz besonders bevorzugt 99% der  
25 Fermentationsdauer größer (>) 0% beträgt. Ein derartiger Stamm ist beispielsweise der von Okamoto (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 61(11), 1877-1882 (1997)) beschriebene Stamm KY10935. Stämme, die nicht in der Lage sind Threonin unter Stickstoffabspaltung abzubauen,  
30 besitzen im Allgemeinen eine abgeschwächte vom tdh-Gen kodierte Threonin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.103). Das Enzym wurde von Aronson et al. (The Journal of Biological Chemistry 264(9), 5226-5232 (1989)) beschrieben. Abgeschwächte tdh-Gene sind beispielsweise bei Ravnika und  
35 Somerville (Journal of Bacteriology, 1986, 168(1), 434-

436), in der US 5,705,371, in der WO 02/26993 und bei Komatsubara (Bioprocess Technology 19, 467-484 (1994)) beschrieben.

Ein geeignetes tdh-Allel ist in der US 5,538,873  
5 beschrieben und in Form des Stammes B-3996 unter der Zugangsnummer 1876 bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) erhältlich. Ein weiteres tdh-Allel ist in der US 5,939,307  
10 beschrieben und in Form des Stammes kat-13 unter der Zugangsnummer NRRL B-21593 bei der Agriculture Research Service Patent Culture Collection (Peoria, Illinois, USA) erhältlich. Schließlich ist ein tdh-Allel in der WO  
02/26993 beschrieben und in Form des Stammes TH21.97 unter  
15 der Zugangsnummer NRRL B-30318 bei der NRRL hinterlegt. Das für eine defekte Threonin Dehydrogenase kodierende Allel tdh-1::cat1212 ist beim E. coli Genetic Stock Center (New Haven, Conn., USA) unter der Zugangsnummer CGSC 6945  
erhältlich.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie  
20 Enterobacteriaceae geeignet, die eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit („leaky“-Phänotyp) besitzen, welche durch Gabe von L-Isoleucin in einer Konzentration von mindestens 10, 20 oder 50 mg/l oder L-Threonin in einer  
Konzentration von mindestens 50, 100 oder 500 mg/l  
25 kompensierbar ist.

Unter Bedürftigkeit bzw. Auxotrophie versteht man im Allgemeinen die Tatsache, dass ein Stamm infolge einer Mutation eine Wildtypfunktion beispielsweise eine  
Enzymaktivität vollständig verloren hat und zum Wachstum  
30 die Zugabe eines Supplementes beispielsweise eine Aminosäure benötigt. Von partieller Bedürftigkeit oder partieller Auxotrophie spricht man dann, wenn infolge einer Mutation eine Wildtypfunktion beispielsweise die Aktivität  
eines Enzyms aus dem Biosyntheseweg einer Aminosäure  
35 beeinträchtigt beziehungsweise abgeschwächt aber nicht

vollständig ausgeschaltet ist. Stämme mit partieller Bedürftigkeit besitzen in Abwesenheit des Supplementes typischerweise eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte, d.h. größer ( $>$ ) 0% und kleiner ( $<$ ) 90%, 50%, 25% oder 10%

5 Wachstumsgeschwindigkeit. In der Literatur wird dieser Zusammenhang auch als „leaky“-Phänotyp oder „leakyness“ bezeichnet (Griffiths et al.: An Introduction to Genetic Analysis. 6<sup>th</sup> edition, 1996, Freeman and Company, New York, USA).

10 Ein Stamm mit einer derartigen partiellen Isoleucin-Bedürftigkeit ist beispielsweise in der WO 01/14525 beschrieben und in Form des Stammes DSM9906 unter der Zugangsnummer KCCM 10168 bei der KCCM hinterlegt. Threonin ausscheidende bzw. produzierende Stämme mit einer

15 Isoleucin-Bedürftigkeit besitzen im Allgemeinen eine abgeschwächte vom *ilvA*-Gen kodierte Threonin-Deaminase (E.C. Nummer 4.3.1.19). Die Threonin-Deaminase ist auch unter dem Namen Threonin-Dehydratase bekannt. Ein abgeschwächtes *ilvA*-Gen, das eine partielle Isoleucin-

20 Auxotrophie bewirkt, ist beispielsweise in der US 4,278,765 beschrieben und in Form des Stammes MG442, hinterlegt unter der Zugangsnummer B-1682, bei der VKPM erhältlich.

Ein weiteres abgeschwächtes *ilvA*-Gen ist beispielsweise in der WO 00/09660 beschrieben und in Form des Stammes DSM  
25 9807, hinterlegt unter der Zugangsnummer KCCM-10132, bei der KCCM erhältlich. Weitere abgeschwächte *ilvA*-Gene sind bei Komatsubara (Bioprocess Technology 19, 467-484 (1994)) beschrieben.

Die Aminosäuresequenz einer geeigneten und neuen Threonin-  
30 Deaminase besteht beispielsweise in der Sequenz von SEQ ID NO. 6 wobei an Position 286 jede Aminosäure außer Glutaminsäure enthalten sein kann. Bevorzugt wird der Austausch Glutaminsäure gegen Lysin (E286K).

Mit dem Begriff „Aminosäure“ sind insbesondere die proteinogenen L-Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Prolin und L-Arginin gemeint.

In SEQ ID NO. 8 ist die Aminosäuresequenz einer Threonin-Deaminase angegeben, die an Position 286 die Aminosäure Lysin enthält; die dazugehörige Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO. 7 dargestellt. Diese enthält an Position 856 die Nukleobase Adenin.

Eine andere geeignete Threonin-Deaminase ist die von Lee et al. (Journal of Bacteriology 185 (18), 5442-5451 (2003)) beschriebene Variante, bei der an Position 97 Serin gegen Phenylalanin (S97F) ausgetauscht ist. Weitere geeignete Threonin-Deaminasen sind die von Fischer und Eisenstein (Journal of Bacteriology 175 (20), 6605-6613 (1993)) beschriebenen Varianten, welche mindestens einen der Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe: Austausch von Asparagin an Position 46 gegen Asparaginsäure (N46D), Austausch von Alanin an Position 66 gegen Valin (A66V), Austausch von Prolin an Position 156 gegen Serin (P156S), Austausch von Glycin an Position 248 gegen Cystein (G248C) und Austausch von Asparaginsäure an Position 266 gegen Tyrosin (D266Y) besitzen.

Durch Insertions- oder Deletions-Mutagenese von mindestens einem Basenpaar beziehungsweise Nukleotid oder durch Insertion oder Deletion von mindestens einem Kodon in der Kodierregion oder durch Einbau eines Stopkodons durch Transitions- oder Transversions-Mutagenese in die Kodierregion des ilvA-Gens lassen sich Allele isolieren, bei denen die Expression des ilvA-Gens im Allgemeinen vollständig ausgeschaltet ist. Diese Methode ist auch auf andere Gene, Allele oder offene Leserahmen wie

beispielsweise das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen übertragbar.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie

Enterobacteriaceae geeignet, die in ihrem Wachstum

- 5 resistent gegenüber der Hemmung durch L-Threonin und/ oder L-Homoserin sind. Threonin-resistente Stämme und deren Herstellung sind beispielsweise bei Astaurova et al. (Prikladnaya Biokhimiya Microbiologiya (1985), 21(5), 485 als englische Übersetzung: Applied Biochemistry and
- 10 Microbiology (1986), 21, 485-490)) beschrieben. Die von Austaurova beschriebene Mutante ist gegenüber 40 mg/ml L-Threonin resistent. Weiterhin ist beispielsweise in der US 5,175,107 der Stamm 472T23 beschrieben, der in Gegenwart von 5 mg/ml L-Threonin wachsen kann und gleichzeitig
- 15 resistent gegen L-Homoserin ist. Der Stamm 472T232 ist unter der Zugangsnummer BKIIM B-2307 bei der VKPM und unter der Nummer ATCC 9801 bei der ATCC erhältlich. Weiterhin ist in der WO 00/09660 der Stamm DSM 9807 beschrieben, der auf einem festen Nährboden wachsen kann, welcher 7% L-Threonin
- 20 enthält. Der Stamm DSM 9807 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10132 bei der KCCM erhältlich. Schließlich ist in der WO 01/14525 der Stamm DSM 9906 beschrieben, der in einem Medium wachsen kann, das 60% bis 70% einer L-Threonin-Fermentationsmutterlauge (L-threonine fermentation mother liquid) enthält. Der Stamm DSM 9906 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10168 bei der KCCM erhältlich.

Es ist bekannt(siehe EP 0994 190 A2 und Livshits et al.

(Research in Microbiology 154, 123-135 (2003)), dass durch Verstärkung des rhtA-Gens Resistenz gegenüber L-Threonin

30 und L-Homoserin hervorgerufen wird. Die Verstärkung kann durch Erhöhung der Kopienzahl des Gens oder durch Einsatz der rhtA23-Mutation erzielt werden.

In der EP 0 994 190 A2 wird beschrieben, dass die

- 35 Verstärkung des rhtB-Gens Resistenz gegenüber L-Homoserin und L-Threonin, insbesondere gegen L-Homoserin bewirkt und

die Threoninproduktion verbessert. Durch Überexpression des RhtB-Genproduktes in einem als N99 bezeichneten Stamm konnte die minimale Hemmkonzentration von 250 µg/ml auf 30000 µg/ml gesteigert werden.

5 In der EP 1 013 765 A1 wird beschrieben, dass eine Verstärkung des rhtC-Gens Resistenz gegenüber L-Threonin hervorruft und die Threoninproduktion verbessert. Als  
10 resistent gegenüber L-Threonin wird ein Stamm bezeichnet, der in Gegenwart einer Konzentration von mindestens 30 mg/ml L-Threonin auf einem Minimalagar wachsen kann. Es wird weiterhin beschrieben, dass eine Verstärkung des rhtB-Gens Resistenz gegenüber L-Homoserin bewirkt und die  
15 Threoninproduktion verbessert. Als resistent gegenüber L-Homoserin wird ein Stamm bezeichnet, der in Gegenwart einer Konzentration von mindestens 5 mg/ml L-Homoserin auf einem Minimalagar wachsen kann. In der genannten Patentanmeldung werden Stämme beschrieben, die resistent gegenüber 10 mg/ml L-Homoserin und resistent gegenüber 50 mg/ml L-Threonin  
20 sind. In der US 4,996,147 wird der Stamm H-4581 beschrieben, der gegen 15 g/l Homoserin resistent ist. Der Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.

25 In der EP 1 016 710 A2 wird beschrieben, dass eine Verstärkung des offenen Leserahmens bzw. Gens yfiK oder yeaS Resistenz gegenüber L-Threonin und L-Homoserin bewirkt. Durch Überexpression des YfiK-Genproduktes in einem als TG1 bezeichneten Stamm konnte die minimale Hemmkonzentration  
30 bezüglich L-Homoserin von 500 µg/ml auf 1000 µg/ml und bezüglich L-Threonin von 30000 µg/ml auf 40000 µg/ml gesteigert werden. Durch Überexpression des YeaS-Genproduktes konnte die minimale Hemmkonzentration  
35 bezüglich L-Homoserin von 500 µg/ml auf 1000 µg/ml und bezüglich L-Threonin von 30000 µg/ml auf 50000 µg/ml gesteigert werden. In der genannten Patentanmeldung wird



weiterhin gezeigt, dass durch Überexpression des YfiK-Genproduktes die Threoninproduktion verbessert wird.

Gemäß diesen technischen Anleitungen werden Stämme hergestellt die in Gegenwart von  $\geq$  (mindestens)  $\geq 5$  g/l,  $\geq 10$ ,  $\geq 20$  g/l,  $\geq 30$  g/l,  $\geq 40$  g/l,  $\geq 50$  g/l,  $\geq 60$  g/l und  $\geq 70$  g/l L-Threonin wachsen können, d. h. gegenüber L-Threonin resistent sind, und für die Herstellung von L-Threonin in einem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind.

10 Für das erfindungsgemäße Verfahren sind insbesondere Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt, und

15 b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor.

20 Für das erfindungsgemäße Verfahren sind außerdem insbesondere Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls  
25 überexprimiert vorliegt,

b) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,

c) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und

30 d) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind ganz besonders Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- 5 a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
- 10 b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor,
- c) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
- 15 d) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- e) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

Darüber hinaus können die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzten Bakterien weiterhin eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweisen:

- 20 • Abschwächung der vom pckA-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,
- Abschwächung der vom pgi-Gen kodierten Phosphoglucose-Isomerase (Froman et al. Molecular and General Genetics 25 217(1):126-31 (1989)).
- Abschwächung des vom offenen Leserahmens ytfP kodierten YtfP-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,

- Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjfA kodierten YjfA-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,
- 5 • Abschwächung der vom poxB-Gen kodierten Pruvat-Oxidase wie beispielsweise in der WO 02/36797 beschrieben,
- 10 • Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjgF kodierten YjgF-Genproduktes wie beispielsweise in der PCT/EP03/14271 beschrieben. Der yjgF-Orf von Escherichia coli ist von Wasinger VC. und Humphery-Smith I. (FEMS Microbiology Letters 169(2): 375-382 (1998)), Volz K. (Protein Science 8(11): 2428-2437 (1999)) und Parsons et al. (Biochemistry 42(1): 80-89 (2003)) beschrieben worden. Die dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000495 in öffentlichen Datenbanken  
15 verfügbar. Der besseren Übersichtlichkeit halber sind diese als SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 10 dargestellt.
- 20 • Verstärkung der von den Genen pntA und pntB kodierten Transhydrogenase wie beispielsweise in der EP 0 733 712 A1 beschrieben,
- Verstärkung der von dem pps-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Synthase wie beispielsweise in der EP 0 877 090 A1 beschrieben,
- 25 • Verstärkung der vom ppc-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxylase wie beispielsweise in der EP 0.723 011 A1 beschrieben, und
- 30 • Verstärkung des vom rseB-Gen kodierten Regulators RseB wie beispielsweise in der EP 1382685 beschrieben. Der Regulator RseB ist von Missiakas et al. (Molecular Microbiology 24(2), 355-371 (1997)), De Las Penas et al. (Molecular Microbiology 24(2): 373-385 (1997)) und Collinet et al. (Journal of Biological Chemistry 275(43): 33898-33904 (2000)) beschrieben worden. Die

dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000343 in öffentlichen Datenbanken verfügbar.

- 5 • Verstärkung des vom galP-Gen kodierten Galaktose-Proton Symporter's (= Galaktose-Permease) wie beispielsweise in der DE 10314618.0 beschrieben. Das galP-Gen und seine Funktion sind von Macpherson et al. (The Journal of Biological Chemistry 258(7): 4390-4396 (1983)) und Venter et al. (The Biochemical Journal 363(Pt 2): 243-252 (2002)) beschrieben worden. Die dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000377 in öffentlichen Datenbanken verfügbar.
- 10 • Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle verwenden zu können. Genetische Determinanten zur Saccharoseverwertung sind im Stand der Technik beispielsweise in der FR-A-2559781, bei Debabov (In: Proceedings of the IV International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms 1982. Kodansha Ltd, Tokyo, Japan, p 254-258), Smith and Parsell (Journal of General Microbiology 87,129-140 (1975)) und Livshits et al. (In: Conference on Metabolic Bacterial Plasmids. Tartusk University Press, Tallin, Estland (1982), p 132-134 und 144-146) und in der US 5,705,371 beschrieben. Die genetischen Determinanten zur Saccharoseverwertung des von Smith und Parsell beschriebenen Stammes H155 wurden durch Konjugation in eine gegen Nalidixinsäure resistente Mutante von Escherichia coli K-12 überführt und die entsprechende Transkonjugante am 16. März 2004 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) als DSM 16293 hinterlegt. Genetische Determinanten zur Saccharoseverwertung sind ebenfalls in dem in der US 5,631,157 beschriebenen Stamm 472T23 enthalten, der bei der ATCC unter Bezeichnung

ATCC 9801 erhältlich ist. Eine weitere genetische Determinante zur Saccharoseverwertung wurde von Bockmann et al. (Molecular and General Genetics 235, 22-32 (1992)) beschrieben und ist unter der Bezeichnung csc-System bekannt.

5

- Verstärkung des vom offenen Leserahmen yedA kodierten YedA-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 03/044191 beschrieben.

10

- Wachstum in Gegenwart mindestens 0,1 bis 0,5 mM oder mindestens 0,5 bis 1 mM Borrelidin (Borrelidinresistenz) wie in US 5,939,307 beschrieben. Der gegen Borrelidin resistente Stamm kat-13 ist unter der Zugangsnummer NRRL B-21593 bei der NRRL erhältlich.

15

- Wachstum in Gegenwart von mindestens 2 bis 2,5 g/l oder mindestens 2,5 bis 3 g/l Diaminovernsteinsäure (Diaminovernsteinsäure Resistenz) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen Diaminovernsteinsäure resistente Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.

20

- Wachstum in Gegenwart von mindestens 30 bis 40 mM oder mindestens 40 bis 50 mM  $\alpha$ -Methylserin ( $\alpha$ -Methylserin Resistenz) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen  $\alpha$ -Methylserin resistente Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.

25

- Wachstum in Gegenwart von höchstens 30 mM oder höchstens 40 mM oder höchstens 50 mM Fluorobrenztraubensäure (Fluorobrenztraubensäure Sensitivität) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen Fluorobrenztraubensäure sensitive Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.

30

- Wachstum in Gegenwart von mindestens 210 mM oder mindestens 240 mM oder mindestens 270 mM oder mindestens 300 mM L-Glutaminsäure (Glutaminsäure Resistenz) wie in

WO 00/09660 beschrieben. Der gegen Glutaminsäure resistente Stamm DSM 9807 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10132 bei der KCCM erhältlich.

- Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für Methionin.  
5 Ein Stamm mit einer mindestens partiellen Methionin Bedürftigkeit ist beispielsweise der in der US 5,017,483 beschriebene Stamm H-4257, der unter der Zugangsnummer FERM BP-984 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich ist. Durch  
10 Zugabe von mindestens 25, 50 oder 100 mg/l L-Methionin ist die Bedürftigkeit kompensierbar.
- Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für m-Diaminopimelinsäure. Ein Stamm mit einer mindestens  
15 partiellen m-Diaminopimelinsäure Bedürftigkeit ist beispielsweise der in der US 5,017,483 beschriebene Stamm H-4257, der unter der Zugangsnummer FERM BP-984 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich ist. Durch Zugabe von  
20 mindestens 25, 50 oder 100 mg/l m-Diaminopimelinsäure ist die Bedürftigkeit kompensierbar.
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 100 mg/l Rifampicin (Rifampicin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen Rifampicin resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute  
25 of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Lysin (Lysin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen L-Lysin resistente Stamm H-4581 ist unter der  
30 Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l Methionin (Methionin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben.

Der gegen Methionin resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.

- 5 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Asparaginsäure (Asparaginsäure Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen L-Asparaginsäure resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial  
10 Science and Technology erhältlich.
- Verstärkung der vom pyc-Gen kodierten Pyruvat-Carboxylase. Geeignete pyc-Gene bzw. Allele sind beispielsweise die von *Corynebacterium glutamicum* (WO 99/18228, WO 00/39305 und WO 02/31158), *Rhizobium etli*  
15 (US 6,455,284), *Bacillus subtilis* (EP 1092776). Gegebenfalls kann auch das pyc-Gen von weiteren Mikroorganismen verwendet werden, die endogen eine Pyruvat-Carboxylase enthalten, wie beispielsweise *Methanobacterium thermoautotrophicum* oder *Pseudomonas fluorescens*.  
20

Bei Verwendung Saccharose-haltiger Nährmedien werden die Stämme mit genetischen Determinanten zur Saccharoseverwertung ausgerüstet.

- Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang  
25 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des offenen Leserahmens, Gens oder Allels bzw. der offenen  
30 Leserahmen, Gene oder Allele um mindestens eine (1) Kopie erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Bei den Maßnahmen der Verstärkung und auch bei den Maßnahmen der Abschwächung wird die Verwendung endogener Gene, Allele oder offener Leserahmen im Allgemeinen bevorzugt. Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder offene Leserahmen oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Bei Verwendung von Plasmiden zur Erhöhung der Kopienzahl werden diese gegebenenfalls stabilisiert durch einen oder mehreren der genetischen Orte (Loci) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem *parB* Locus des Plasmides R1 beschrieben von Rasmussen et al. (Molecular and General Genetics 209 (1), 122-128 (1987)), Gerdes et al. (Molecular Microbiology 4 (11), 1807-1818 (1990)) und Thistedt und Gerdes (Journal of Molecular Biology 223 (1), 41-54 (1992)), dem *flm* Locus des F Plasmids beschrieben von Loh et al. (Gene 66 (2), 259-268 (1988)), dem *par* Locus des Plasmids pSC101 beschrieben von Miller et al. (Gene 24 (2-3), 309-315 (1983)), dem *cer* Locus des Plasmids ColE1 beschrieben von Leung et al. (DNA 4 (5), 351-355 (1985)), dem *par* Locus des Plasmids RK2 beschrieben von Sobecky et al. (Journal of Bacteriology 178 (7), 2086-2093 (1996)) und Roberts and Helinsky (Journal of Bacteriology 174 (24), 8119-8132 (1992)), dem *par* Locus des Plasmids RP4 beschrieben von Eberl et al. (Molecular Microbiology 12 (1), 131-141 (1994)) and dem *parA* Locus des Plasmids R1 beschrieben von Gerdes and Molin (Journal of Molecular Biology 190 (3), 269- 279 (1986)), Dam and Gerdes (Journal of Molecular Biology 236 (5), 1289- 1298 (1994)) and Jensen et al (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95 (15), 8550-8555 (1998)).

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins oder Enzyms im Allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%



oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

- 5 Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen oder funktionellen Eigenschaften der Enzyme oder Proteine erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
- 10 So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene um mindestens eine (1) erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des
- 15 Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer
- 20 der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom
- 25 integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem
- 30 Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder einen offenen
- 35 Leserahmen oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein

entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym bzw. Protein oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins oder Enzyms im Allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10%, 0 bis 5% oder 0 bis 1% oder 0 bis 0,1% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise  
10 der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

- Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression der Gene oder offenen Leserahmen oder die katalytischen oder funktionellen Eigenschaften der Enzyme  
15 oder Proteine herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

- Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch  
20 Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem  
25 beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15: 58-64 (1999)), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3: 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und  
30 Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung beziehungsweise Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5511-5515 (1998)), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266: 20833-20839 (1991)) genannt.

- 10 Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

- Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen von mindestens einem (1) Basenpaar bzw. Nukleotid in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des durch die Mutation hervorgerufenen Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Die Fehlsinnmutation führt zu einem Austausch einer gegebenen Aminosäure in einem Protein gegen eine andere, wobei es sich insbesondere um einen nicht-konservativen Aminosäureaustausch handelt. Hierdurch wird die Funktionsfähigkeit bzw. Aktivität des Proteins beeinträchtigt und auf einen Wert von 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10%, 0 bis 5% 0 bis 1% oder 0 bis 0,1% reduziert. Die Nichtsinnmutation führt zu einem Stop-Kodon im Kodierbereich des Gens und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), die dazu führen, dass falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Entsteht als Folge der Mutation ein Stop-Kodon im Kodierbereich, so führt dies ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation.

Deletionen von mindestens einem (1) oder mehreren Kodonen führen typischerweise ebenfalls zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität beziehungsweise Funktion.

Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Stämme sind unter anderem der in der US 5,175,107 beschriebene Stamm BKIIM B-3996, der in der WO 00/09660 beschriebene Stamm KCCM-10132 und Isoleucin bedürftige Mutanten des in der WO 98/04715 beschriebenen Stammes kat-13 geeignet.

Gegebenenfalls können Stämme mit den genannten Maßnahmen, insbesondere durch Einbau eines Stopkodons in das rpoS-Gen, beispielsweise eines amber-Kodons an die Stelle entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Proteins und gleichzeitigem Einbau eines korrespondierenden t-RNA-Suppressors beispielsweise supE an das erfindungsgemäße Verfahren adaptiert werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Stämme können auch dadurch identifiziert werden, dass man die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens in einem L-Threonin ausscheidenden Stamm von Escherichia coli bestimmt. Hierzu wird das rpoS-Gen kloniert oder mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und die Nukleotidsequenz bestimmt. Enthält das rpoS-Gen ein Stopkodon, so wird in einem zweiten Schritt geprüft, ob er ebenfalls einen korrespondierenden t-RNA-Suppressor enthält. Gegebenenfalls wird der auf diese Weise identifizierte Stamm mit den oben beschriebenen Eigenschaften wie beispielsweise Überexpression des thrA-Allels, Abschwächung des unter aeroben Kulturbedingungen stattfindenden Threoninabbaus, Einführung einer mindestens partiellen Isoleucin-Bedürftigkeit bewirkenden Mutation in das ilvA-Gen oder Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin oder mit einer oder mehreren der weiterhin aufgeführten Eigenschaften versehen.

Die genannten Eigenschaften beziehungsweise Merkmale können durch Transformation, Transduktion oder Konjugation in gewünschte Stämme übertragen werden.

- Bei der Methode der Transformation wird isoliertes
- 5 genetisches Material typischerweise DNA in einen Empfängerstamm eingeführt. Bei Bakterien der Familie Enterobacteriaceae wie z. B. Escherichia coli wird die DNA dazu in vitro in Plasmid- oder Phagen-DNA eingebaut und diese dann in den Empfängerstamm überführt. Die
- 10 entsprechenden Methoden und Arbeitsvorschriften sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt und beispielsweise im Handbuch von J. Sambrook (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) ausführlich beschrieben.
- 15 Mit Hilfe der Methode des Gen- bzw. Allelaustauschs unter Verwendung konditional replizierender Plasmide können definierte Mutationen in geeignete Stämme transferiert werden. Bei einer definierten Mutation ist mindestens die Position im Chromosom, vorzugsweise die exakte Position der
- 20 Veränderung der Nukleobase(n) und die Art der Änderung (Substitution, d.h. Transition oder Transversion, Insertion oder Deletion) bekannt. Gegebenenfalls wird die entsprechende DNA zunächst mit gebräuchlichen Methoden sequenziert. Eine gebräuchliche Methode zur Erzielung eines
- 25 Gen- bzw. eines Allelaustauschs ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)) beschriebene, bei der das temperatursensitiv replizierende pSC101-Derivat pMAK705 verwendet wird. Mit dieser Methode können Allele vom Plasmid in das Chromosom überführt
- 30 werden. In gleicher Weise können chromosomale Allele auf das Plasmid überführt werden. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 181: 7143-7148 (1999)), die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182:

842-847 (2000)) oder die in der WO 01/77345 beschriebene Methode können gleichfalls benutzt werden.

Diese Methode kann unter anderem eingesetzt werden, um rpoS-Allele, die beispielsweise Stop-Kodons enthalten, Suppressorgene wie beispielsweise supE, abgeschwächte tdh-Allele, die beispielsweise Deletionen enthalten, abgeschwächte ilvA-Allele, thrA-Allele, die für „feed back“ resistente Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, die rhtA23-Mutation, abgeschwächte pck-Allele, abgeschwächte Allele des ytfP-ORF's, abgeschwächte yjfa-ORF's, abgeschwächte poxB-Allele, abgeschwächte yjgF-ORF's in gewünschte Stämme einzufügen.

Bei der Methode der Transduktion wird ein genetisches Merkmal von einem Donorstamm unter Verwendung eines Bacteriophagen in einen Empfängerstamm übertragen. Diese Methode gehört zum Stand der Technik und ist in Lehrbüchern wie beispielsweise dem von E. A. Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4th ed., Springer Verlag, New York, USA, 2000) beschrieben.

Bei Escherichia coli wird typischerweise der Bacteriophage P1 für die generalisierte Transduktion (generalized transduction) (Lennox, Virology 1, 190-206 (1955)) verwendet. Eine Zusammenfassung über die Methode der generalisierten Transduktion gibt der Aufsatz „Generalized Transduktion“ von M. Masters, der im Lehrbuch von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996) enthalten ist. Praktische Anleitungen sind beispielsweise im Handbuch von J. H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1992) oder dem Handbuch von P. Gerhardt „Manual of Methods for General Bacteriology“ (American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) enthalten.

Mit Hilfe der Transduktion lassen sich Resistenz vermittelnde oder andere dominante genetische Eigenschaften wie beispielsweise Antibiotika-Resistenz (zum Beispiel Kanamycin-Resistenz, Chloramphenicol-Resistenz, Rifampicin-Resistenz oder Borrelidin-Resistenz), Resistenz gegen Antimetabolite (zum Beispiel  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure-Resistenz,  $\alpha$ -Methyl-Serin-Resistenz oder Diaminovernsteinsäure-Resistenz), Resistenz gegen Metabolite (zum Beispiel Threonin-Resistenz, Homoserin-Resistenz, Glutaminsäure-Resistenz, Methionin-Resistenz, Lysin-Resistenz oder Asparaginsäure-Resistenz) oder auch die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung in geeignete Empfängerstämme übertragen.

Die Methode der Transduktion ist ebenfalls geeignet um sogenannte nicht selektierbare genetische Eigenschaften wie beispielsweise Aminosäure-Auxotrophien bzw. Bedürftigkeiten (zum Beispiel Isoleucin-Bedürftigkeit, Methionin-Bedürftigkeit oder m-Diaminopimelinsäure-Bedürftigkeit), Vitamin-Bedürftigkeiten oder Sensitivität gegen Antimetabolite (zum Beispiel Fluorobrenztraubensäure-Sensitivität) in Empfängerstämme einzuführen. Hierzu verwendet man E. coli Stämme, die in einem Abstand von ungefähr einer Minute auf dem Chromosom das Transposon Tn10 oder Tn10kan enthalten. Diese Stämme sind unter dem Begriff „Singer Kollektion“ oder „Singer/Gross Kollektion“ bekannt (Singer et al., Microbiological Reviews 53, 1-24, 1989). Diese Stämme sind beim E. coli Genetic Stock Center der Universität Yale (New Haven, CT, USA) allgemein verfügbar. Weitere Angaben findet man in dem Aufsatz von M. K. B. Berlyn et al. "Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 9", der im Lehrbuch von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996) enthalten ist. In ähnlicher Weise lassen sich nicht direkt selektierbare genetische Eigenschaften (zum Beispiel Fluorobrenztraubensäure-Sensitivität, Suppressormutationen)

und auch solche, deren Mutationsort nicht bekannt ist, in verschiedene Stämme übertragen. Anleitungen hierzu findet man unter anderem in dem Lehrbuch von J. Scaife et al.

(Genetics of Bacteria, Academic Press, London, UK, 1985),

5 in dem oben erwähnten Aufsatz von M. Masters und in dem oben erwähnten Handbuch von J. H. Miller. Das mit dem Transposon Tn10 eingeführte Tetrazyklin-Resistenzgen kann gegebenenfalls mit der von Bochner et al. (Journal of Bacteriology 143, 926-933 (1980)) beschriebenen Methode  
10 wieder entfernt werden.

Bei der Methode Konjugation wird genetisches Material durch Zell-Zell Kontakt von einem Donor in einen Empfänger übertragen. Der konjugative Transfer des F-Faktors (F:

feritility) , der konjugative Gentransfer unter Verwendung  
15 von Hfr-Stämmen (Hfr: high frequency of recombination) und Stämmen, die einen F'-Faktor (F': F prime) tragen, gehören zu den klassischen Verfahren der Genetik. Zusammenfassende Darstellungen findet man unter anderem in dem Standardwerk von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella

20 Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996). Praktische Anleitungen sind beispielsweise im Handbuch von J. H. Miller (A Short Course In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor  
25 Laboratory Press, New York, USA, 1992) oder dem Handbuch von P. Gerhardt „Manual of Methods for General Bacteriology“ (American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) enthalten. F-, F' und Hfr-Stämme sind beim E. coli Genetic Stock Center der Universität Yale  
30 (New Haven, CT, USA) allgemein verfügbar.

Die Methode der Konjugation wurde beispielsweise eingesetzt, um die von Thèze und Saint-Girons (Journal of Bacteriology 118, 990-998 (1974)) beschriebene Mutation thrC1010 in den Stamm MG442 (Debabov, Advances in

35 Biochemical Engineering/Biotechnology 79, 113-136 (2003) zu



transferieren. Im Stand der Technik beispielsweise bei Schmid et al. (Journal of Bacteriology 151, 68-76 (1982)) oder Smith und Parsell (Journal of General Microbiology 87, 129-140 (1975)) und Livshits et al. (In: Conference on  
5 Metabolic Bacterial Plasmids. Tartusk University Press, Tallin, Estland (1982), p 132-134 und 144-146) sind konjugative Plasmide beschrieben, die die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung tragen. So berichtet Debabov (In:  
10 Proceedings of the IVth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms 1982. Kodansha Ltd, Tokyo, Japan, p 254-258) von der Konstruktion Threonin produzierender Stämme, in die mit Hilfe der Konjugation die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung eingebaut wurde.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inokuliert und kultiviert,
- b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen, wobei
- c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der kontinuierlichen Kultivierung in Schritt (b) bei maximal 30 g/l eingestellt wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Zulaufverfahren (fed batch) durchgeführt wird, wobei mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
- 5 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.
- 10 6. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass, bezogen auf den Beginn des Satzverfahrens, das weitere oder die weiteren Nährmedien nach >0 bis 20 Stunden zugeführt wird (werden).
- 15 7. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass, bezogen auf den Beginn des Zulaufverfahrens, das weitere oder die weiteren Nährmedien nach >0 bis 80 Stunden zugeführt wird (werden).
- 20 8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Kohlenstoffquelle um eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol handelt.
- 25 9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Stickstoffquelle um eine oder mehrere organische, Stickstoff-haltige Stoffe oder Stoffgemische ausgewählt aus der Gruppe Peptone, Hefeextrakte, Fleischextrakte, Malzextrakte, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff und/oder
- 30 um eine oder mehrere der anorganischen Verbindungen

ausgewählt aus der Gruppe Ammoniak, Ammonium-haltige Salze und Salze der Salpetersäure handelt.

- 5 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei Ammonium-haltigen Salzen und Salzen der Salpetersäure um Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat und Kaliumnatriumnitrat handelt.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Phosphorquelle um Phosphorsäure oder deren Polymere oder um Phytinsäure oder deren Alkali- oder Erdalkalisalze handelt.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Alkalisalzen der Phosphorsäure um Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze handelt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% des Zufütterungsstroms oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Beginn der Entnahme oder der Entnahmen zeitgleich oder zeitlich versetzt zur Zufütterung oder der Summe der Zufütterungen erfolgt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Bakterien der Familie Enterobacteriaceae um die Art Escherichia coli handelt.
- 30 16. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae mindestens ein thrA-Gen oder Allel enthält, das für

eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthält.
18. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Zufütterungsstrom oder die Summe der Zufütterungsströme mit einer Geschwindigkeit entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner 30 Stunden, kleiner 25, kleiner 20 Stunden hinzugeführt wird.
19. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem zugeführtem Nährmedium oder den zugeführten Nährmedien ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 eingestellt wird.
20. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen wird bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter 1 g/l; unter 0,5 g/l sinkt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
22. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen

Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.

- 5 23. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 20, 10 oder 5 g/l eingestellt wird.
- 10 24. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 oder 2 g/l eingestellt wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 g/l eingestellt wird.
- 15 26. Verfahren gemäß Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 2 g/l eingestellt wird.
- 20 27. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 31 % beträgt.
- 25 28. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 37 % beträgt.
- 30 29. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 42 % beträgt.

30. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.
- 5 31. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std. gebildet wird.
- 10 32. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 15 33. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zulaufverfahren im Kultivierungsschritt (a) angewandt wird, und dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 5,0 bis mehr als 8,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 20 34. Saccharose verwertende Transkonjugante von Escherichia coli K-12 hinterlegt als DSM 16293 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland).
- 25 35. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:
- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt, und
- b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor.
- 30

36. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
- b) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen,
- c) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- d) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

37. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
- b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor,
- c) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
- d) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- e) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.



38. Verfahren gemäß Anspruch 35, 36 oder 37, dadurch gekennzeichnet, dass der eingesetzte Stamm zusätzlich eines oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe

- 5      38.1    Abschwächung der vom pckA-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase,
- 38.2    Abschwächung der vom pgi-Gen kodierten Phosphoglucose-Isomerase,
- 10      38.3    Abschwächung des vom offenen Leserahmens ytfP kodierten YtfP-Genproduktes,
- 38.4    Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjfa kodierten Yjfa-Genproduktes,
- 38.5    Abschwächung der vom poxB-Gen kodierten Pruvat-Oxidase,
- 15      38.6    Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjgF kodierten YjgF-Genproduktes,
- 38.7    Verstärkung der von den Genen pntA und pntB kodierten Transhydrogenase,
- 38.8    Verstärkung der von dem pps-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Synthase,
- 38.9    Verstärkung der vom ppc-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxylase,
- 38.10   Verstärkung des vom rseB-Gen kodierten Regulators RseB,
- 25      38.11   Verstärkung des vom galP-Gen kodierten Galaktose-Proton Symporter's,
- 38.12   Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle verwenden zu können,

- 38.13 Verstärkung des vom offenen Leserahmens yedA  
kodierten YedA-Genproduktes,
- 5 38.14 Wachstum in Gegenwart mindestens 0,1 bis 0,5 mM  
oder mindestens 0,5 bis 1 mM Borrelidin  
(Borrelidinresistenz) ,
- 38.15 Wachstum in Gegenwart von mindestens 2 bis 2,5  
g/l oder mindestens 2,5 bis 3 g/l  
Diaminobernsteinsäure (Diaminobernsteinsäure  
Resistenz),
- 10 38.16 Wachstum in Gegenwart von mindestens 30 bis 40  
mM oder mindestens 40 bis 50 mM  $\alpha$ -Methylserin  
( $\alpha$ -Methylserin Resistenz),
- 15 38.17 Wachstum in Gegenwart von höchstens 30 mM oder  
höchstens 40 mM oder höchstens 50 mM  
Fluorobrenztraubensäure  
(Fluorobrenztraubensäure Sensitivität),
- 20 38.18 Wachstum in Gegenwart von mindestens 210 mM  
oder mindestens 240 mM oder mindestens 270 mM  
oder mindestens 300 mM L-Glutaminsäure  
(Glutaminsäure Resistenz),
- 38.19 Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für  
Methionin,
- 38.20 Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für m-  
Diaminopimelinsäure,
- 25 38.21 Wachstum in Gegenwart von mindestens 100 mg/l  
Rifampicin (Rifampicin Resistenz),
- 38.22 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-  
Lysin (Lysin Resistenz),
- 30 38.23 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l  
Methionin (Methionin Resistenz),

38.24 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Asparaginsäure (Asparaginsäure Resistenz), und

38.25 Verstärkung der vom pyc-Gen kodierten Pyruvat-Carboxylase

5  
enthalten.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie

5 Enterobacteriaceae.

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Degussa AG

<120> Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

10 <130> 030217BT

15 <160> 10

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1  
 <211> 993  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(990)  
 <223> rpoS-Gen

30 <400> 1

atg agt cag aat acg ctg aaa gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa	48
Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu	
1 5 10 15	
ttt gat gag aac gga gtt gag gtt ttt gac gaa aag gcc tta gta gaa	96
Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu	
20 25 30	
cag gaa ccc agt gat aac gat ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag	144
Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln	
35 40 45	
gga gcc aca cag cgt gtg ttg gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag	192
Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu	
50 55 60	
att ggt tat tca cca ctg tta acg gcc gaa gaa gaa gtt tat ttt gcg	240
Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala	
65 70 75 80	
cgt cgc gca ctg cgt gga gat gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag	288
Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu	
85 90 95	
agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt	336
Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg	
100 105 110	

60

	ggg ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc	384
	Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile	
	115 120 125	
5	cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca	432
	Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr	
	130 135 140	
10	tac gca acc tgg tgg att cgc cag acg att gaa cgg gcg att atg aac	480
	Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn	
	145 150 155 160	
15	caa acc cgt act att cgt ttg ccg att cac atc gta aag gag ctg aac	528
	Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn	
	165 170 175	
20	gtt tac ctg cga acc gca cgt gag ttg tcc cat aag ctg gac cat gaa	576
	Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu	
	180 185 190	
25	cca agt gcg gaa gag atc gca gag caa ctg gat aag cca gtt gat gac	624
	Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp	
	195 200 205	
30	gtc agc cgt atg ctt cgt ctt aac gag cgc att acc tgc gta gac acc	672
	Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr	
	210 215 220	
35	ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa aaa gcg ttg ctg gac atc ctg gcc gat	720
	Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp	
	225 230 235 240	
40	gaa aaa gag aac ggt ccg gaa gat acc acg caa gat gac gat atg aag	768
	Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys	
	245 250 255	
45	cag agc atc gtc aaa tgg ctg ttc gag ctg aac gcc aaa cag cgt gaa	816
	Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu	
	260 265 270	
50	gtg ctg gca cgt cga ttc ggt ttg ctg ggg tac gaa gcg gca aca ctg	864
	Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu	
	275 280 285	
55	gaa gat gta ggt cgt gaa att ggc ctc acc cgt gaa cgt gtt cgc cag	912
	Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln	
	290 295 300	
60	att cag gtt gaa ggc ctg cgc cgt ttg cgc gaa atc ctg caa acg cag	960
	Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln	
	305 310 315 320	
65	ggg ctg aat atc gaa gcg ctg ttc cgc gag taa	993
	Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu	
	325 330	
	<210> 2	
	<211> 330	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	

&lt;400&gt; 2

1	Met	Ser	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Val	His	Asp	Leu	Asn	Glu	Asp	Ala	Glu
				5						10					15	
5	Phe	Asp	Glu	Asn	Gly	Val	Glu	Val	Phe	Asp	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Glu
				20					25					30		
10	Gln	Glu	Pro	Ser	Asp	Asn	Asp	Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Gln
			35					40					45			
15	Gly	Ala	Thr	Gln	Arg	Val	Leu	Asp	Ala	Thr	Gln	Leu	Tyr	Leu	Gly	Glu
		50					55					60				
20	Ile	Gly	Tyr	Ser	Pro	Leu	Leu	Thr	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Tyr	Phe	Ala
	65					70				75					80	
25	Arg	Arg	Ala	Leu	Arg	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Arg	Arg	Arg	Met	Ile	Glu
				85						90					95	
30	Ser	Asn	Leu	Arg	Leu	Val	Val	Lys	Ile	Ala	Arg	Arg	Tyr	Gly	Asn	Arg
				100					105					110		
35	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu	Glu	Gly	Asn	Leu	Gly	Leu	Ile
			115					120					125			
40	Arg	Ala	Val	Glu	Lys	Phe	Asp	Pro	Glu	Arg	Gly	Phe	Arg	Phe	Ser	Thr
		130					135					140				
45	Tyr	Ala	Thr	Trp	Trp	Ile	Arg	Gln	Thr	Ile	Glu	Arg	Ala	Ile	Met	Asn
	145					150					155				160	
50	Gln	Thr	Arg	Thr	Ile	Arg	Leu	Pro	Ile	His	Ile	Val	Lys	Glu	Leu	Asn
				165						170					175	
55	Val	Tyr	Leu	Arg	Thr	Ala	Arg	Glu	Leu	Ser	His	Lys	Leu	Asp	His	Glu
				180					185					190		
60	Pro	Ser	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala	Glu	Gln	Leu	Asp	Lys	Pro	Val	Asp	Asp
			195					200					205			
65	Val	Ser	Arg	Met	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Arg	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Thr
		210					215					220				
70	Pro	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Glu	Lys	Ala	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Ala	Asp
	225					230					235				240	
75	Glu	Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Glu	Asp	Thr	Thr	Gln	Asp	Asp	Asp	Met	Lys
				245						250					255	
80	Gln	Ser	Ile	Val	Lys	Trp	Leu	Phe	Glu	Leu	Asn	Ala	Lys	Gln	Arg	Glu
			260						265					270		
85	Val	Leu	Ala	Arg	Arg	Phe	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu
			275					280					285			
90	Glu	Asp	Val	Gly	Arg	Glu	Ile	Gly	Leu	Thr	Arg	Glu	Arg	Val	Arg	Gln
	290						295					300				
95	Ile	Gln	Val	Glu	Gly	Leu	Arg	Arg	Leu	Arg	Glu	Ile	Leu	Gln	Thr	Gln
	305					310					315				320	

Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu  
                                   325                                  330

5     <210> 3  
       <211> 993  
       <212> DNA  
       <213> Escherichia coli

10    <220>  
       <221> Allel  
       <222> (1)..(990)  
       <223> rpoS-Allel

15    <220>  
       <221> misc\_feature  
       <222> (97)..(99)  
       <223> amber-Codon

20    <400> 3  
       atgagtcaga atacgctgaa agttcatgat ttaaatagaag atgcggaatt tgatgagaac     60

25    ggagttgagg tttttgacga aaaggcctta gtagaatagg aaccagtgta taacgatttg     120

      gccgaagagg aactgttatc gcagggagcc acacagcgtg tgttggacgc gactcagctt     180

30    taccttggtg agattgggta ttcaccactg ttaacggccg aagaagaagt ttattttgcg     240

      cgtcgcgcac tgcgtggaga tgtcgcctct cgccgcgcga tgatcgagag taacttgcgt     300

      ctgggtggtaa aaattgccccg ccgttatggc aatcgtgggtc tggcgttgct ggaccttatac     360

35    gaagagggca acctgggggt gatccgcgcg gtagagaagt ttgacccgga acgtgggtttc     420

      cgcttctcaa catacgcaac ctgggtggatt cgccagacga ttgaacgggc gattatgaac     480

      caaaccgta ctattcggtt gccgattcac atcgtaaagg agctgaacgt ttacctgcga     540

40    accgcacgtg agttgtccca taagctggac catgaaccaa gtgcggaaga gatcgagag     600

      caactggata agccagttga tgacgtcagc cgtatgcttc gtcttaacga gcgcattacc     660

45    tcggtagaca ccccgctggg tgggtattcc gaaaaagcgt tgctggacat cctggccgat     720

      gaaaaagaga acggtccgga agataccacg caagatgacg atatgaagca gagcatcgtc     780

50    aaatggctgt tcgagctgaa cgccaaacag cgtgaagtgc tggcacgtcg attcggttg     840

      ctggggtacg aagcggcaac actggaagat gtaggtcgtg aaattggcct caccctgtaa     900

      cgtgttcgcc agattcaggt tgaaggcctg cgccgtttgc gcgaaatcct gcaaacgcag     960

55    gggctgaata tcgaagcgct gttccgcgag taa     993

60    <210> 4  
       <211> 75  
       <212> DNA  
       <213> Escherichia coli



<220>  
 <221> tRNA  
 <222> (1)..(75)  
 <223> supE-Allel

5

<400> 4  
 tgggggtatcg ccaagcggta aggcaccgga ttctaattcc ggcattccga ggttcgaatc 60

10 ctcgtacccc agcca 75

<210> 5  
 <211> 1545  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1542)  
 <223> ilvA-Gen

20

<400> 5  
 atg gct gac tcg caa ccc ctg tcc ggt gct ccg gaa ggt gcc gaa tat 48  
 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr  
 1 5 10 15

25

tta aga gca gtg ctg cgc gcg ccg gtt tac gag gcg gcg cag gtt acg 96  
 Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr  
 20 25 30

30

ccg cta caa aaa atg gaa aaa ctg tcg tcg cgt ctt gat aac gtc att 144  
 Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile  
 35 40 45

35

ctg gtg aag cgc gaa gat cgc cag cca gtg cac agc ttt aag ctg cgc 192  
 Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg  
 50 55 60

40

ggc gca tac gcc atg atg gcg ggc ctg acg gaa gaa cag aaa gcg cac 240  
 Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His  
 65 70 75 80

45

ggc gtg atc act gct tct gcg ggt aac cac gcg cag ggc gtc gcg ttt 288  
 Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe  
 85 90 95

50

tct tct gcg cgg tta ggc gtg aag gcc ctg atc gtt atg cca acc gcc 336  
 Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala  
 100 105 110

55

acc gcc gac atc aaa gtc gac gcg gtg cgc ggc ttc ggc ggc gaa gtg 384  
 Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val  
 115 120 125

60

ctg ctc cac ggc gcg aac ttt gat gaa gcg aaa gcc aaa gcg atc gaa 432  
 Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu  
 130 135 140

ctg tca cag cag cag ggg ttc acc tgg gtg ccg ccg ttc gac cat ccg 480  
 Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro  
 145 150 155 160

	atg gtg att gcc ggg caa ggc acg ctg gcg ctg gaa ctg ctc cag cag	528
	Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln	
	165 170 175	
5	gac gcc cat ctc gac cgc gta ttt gtg cca gtc ggc ggc ggc ggt ctg	576
	Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu	
	180 185 190	
10	gct gct ggc gtg gcg gtg ctg atc aaa caa ctg atg ccg caa atc aaa	624
	Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys	
	195 200 205	
15	gtg atc gcc gta gaa gcg gaa gac tcc gcc tgc ctg aaa gca gcg ctg	672
	Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu	
	210 215 220	
20	gat gcg ggt cat ccg gtt gat ctg ccg cgc gta ggg cta ttt gct gaa	720
	Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu	
	225 230 235 240	
25	ggc gta gcg gta aaa cgc atc ggt gac gaa acc ttc cgt tta tgc cag	768
	Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln	
	245 250 255	
30	gag tat ctc gac gac atc atc acc gtc gat agc gat gcg atc tgt gcg	816
	Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala	
	260 265 270	
35	gcg atg aag gat tta ttc gaa gat gtg cgc gcg gtg gcg gaa ccc tct	864
	Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Glu Pro Ser	
	275 280 285	
40	ggc gcg ctg gcg ctg gcg gga atg aaa aaa tat atc gcc ctg cac aac	912
	Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn	
	290 295 300	
45	att cgc ggc gaa cgg ctg gcg cat att ctt tcc ggt gcc aac gtg aac	960
	Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn	
	305 310 315 320	
50	ttc cac ggc ctg cgc tac gtc tca gaa cgc tgc gaa ctg ggc gaa cag	1008
	Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln	
	325 330 335	
55	cgt gaa gcg ttg ttg gcg gtg acc att ccg gaa gaa aaa ggc agc ttc	1056
	Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe	
	340 345 350	
60	ctc aaa ttc tgc caa ctg ctt ggc ggg cgt tgc gtc acc gag ttc aac	1104
	Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn	
	355 360 365	
65	tac cgt ttt gcc gat gcc aaa aac gcc tgc atc ttt gtc ggt gtg cgc	1152
	Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg	
	370 375 380	
70	ctg agc cgc ggc ctc gaa gag cgc aaa gaa att ttg cag atg ctc aac	1200
	Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn	
	385 390 395 400	

	gac ggc ggc tac agc gtg gtt gat ctc tcc gac gac gaa atg gcg aag	1248
	Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys	
	405 410 415	
5	cta cac gtg cgc tat atg gtc ggc gga cgt cca tgc cat ccg ttg cag	1296
	Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln	
	420 425 430	
10	gaa cgc ctc tac agc ttc gaa ttc ccg gaa tca ccg ggc gcg ctg ctg	1344
	Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu	
	435 440 445	
15	cgc ttc ctc aac acg ctg ggt acg tac tgg aac att tct ttg ttc cac	1392
	Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His	
	450 455 460	
20	tat cgc agc cat ggc acc gac tac ggg cgc gta ctg gcg gcg ttc gaa	1440
	Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu	
	465 470 475 480	
25	ctt ggc gac cat gaa ccg gat ttc gaa acc cgg ctg aat gag ctg ggc	1488
	Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly	
	485 490 495	
30	tac gat tgc cac gac gaa acc aat aac ccg gcg ttc agg ttc ttt ttg	1536
	Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Leu	
	500 505 510	
35	gcg ggt tag	1545
	Ala Gly	
	<210> 6	
	<211> 514	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
40	<400> 6	
	Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr	
	1 5 10 15	
45	Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr	
	20 25 30	
	Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile	
	35 40 45	
50	Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg	
	50 55 60	
	Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His	
	65 70 75 80	
55	Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe	
	85 90 95	
60	Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala	
	100 105 110	
	Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val	
	115 120 125	

	Leu	Leu	His	Gly	Ala	Asn	Phe	Asp	Glu	Ala	Lys	Ala	Lys	Ala	Ile	Glu	
	130						135					140					
5	Leu	Ser	Gln	Gln	Gln	Gly	Phe	Thr	Trp	Val	Pro	Pro	Phe	Asp	His	Pro	
	145					150					155					160	
	Met	Val	Ile	Ala	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Gln	Gln	
					165					170					175		
10	Asp	Ala	His	Leu	Asp	Arg	Val	Phe	Val	Pro	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	
				180					185					190			
	Ala	Ala	Gly	Val	Ala	Val	Leu	Ile	Lys	Gln	Leu	Met	Pro	Gln	Ile	Lys	
15			195					200					205				
	Val	Ile	Ala	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Cys	Leu	Lys	Ala	Ala	Leu	
	210						215					220					
20	Asp	Ala	Gly	His	Pro	Val	Asp	Leu	Pro	Arg	Val	Gly	Leu	Phe	Ala	Glu	
	225					230					235					240	
	Gly	Val	Ala	Val	Lys	Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Thr	Phe	Arg	Leu	Cys	Gln	
					245					250					255		
25	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Ile	Ile	Thr	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Ile	Cys	Ala	
				260					265					270			
	Ala	Met	Lys	Asp	Leu	Phe	Glu	Asp	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Glu	Pro	Ser	
30			275					280					285				
	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Ile	Ala	Leu	His	Asn	
	290						295					300					
35	Ile	Arg	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	His	Ile	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Val	Asn	
	305					310					315					320	
	Phe	His	Gly	Leu	Arg	Tyr	Val	Ser	Glu	Arg	Cys	Glu	Leu	Gly	Glu	Gln	
					325					330					335		
40	Arg	Glu	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Ile	Pro	Glu	Glu	Lys	Gly	Ser	Phe	
				340					345					350			
	Leu	Lys	Phe	Cys	Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg	Ser	Val	Thr	Glu	Phe	Asn	
45			355					360					365				
	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp	Ala	Lys	Asn	Ala	Cys	Ile	Phe	Val	Gly	Val	Arg	
	370						375					380					
50	Leu	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Glu	Arg	Lys	Glu	Ile	Leu	Gln	Met	Leu	Asn	
	385					390					395					400	
	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	Asp	Leu	Ser	Asp	Asp	Glu	Met	Ala	Lys	
					405					410				415			
55	Leu	His	Val	Arg	Tyr	Met	Val	Gly	Gly	Arg	Pro	Ser	His	Pro	Leu	Gln	
				420					425					430			
	Glu	Arg	Leu	Tyr	Ser	Phe	Glu	Phe	Pro	Glu	Ser	Pro	Gly	Ala	Leu	Leu	
60				435				440					445				

Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His  
 450 455 460  
 5 Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly  
 485 490 495  
 10 Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu  
 500 505 510  
 Ala Gly  
 15  
 <210> 7  
 <211> 1545  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 20  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1542)  
 25 <223> ilvA-Allel  
 <220>  
 <221> mutation.  
 30 <222> (856)..(856)  
 <223>  
 <400> 7  
 35 atg gct gac tcg caa ccc ctg tcc ggt gct ccg gaa ggt gcc gaa tat 48  
 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr  
 1 5 10 15  
 tta aga gca gtg ctg cgc gcg ccg gtt tac gag gcg gcg cag gtt acg 96  
 40 Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr  
 20 25 30  
 ccg cta caa aaa atg gaa aaa ctg tcg tcg cgt ctt gat aac gtc att 144  
 45 Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile  
 35 40 45  
 ctg gtg aag cgc gaa gat cgc cag cca gtg cac agc ttt aag ctg cgc 192  
 Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg  
 50 50 55 60  
 ggc gca tac gcc atg atg gcg ggc ctg acg gaa gaa cag aaa gcg cac 240  
 Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His  
 65 70 75 80  
 55 ggc gtg atc act gct tct gcg ggt aac cac gcg cag ggc gtc gcg ttt 288  
 Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe  
 85 90 95  
 tct tct gcg cgg tta ggc gtg aag gcc ctg atc gtt atg cca acc gcc 336  
 60 Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala  
 100 105 110

	acc gcc gac atc aaa gtc gac gcg gtg cgc ggc ttc ggc ggc gaa gtg	384
	Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val	
	115 120 125	
5	ctg ctc cac ggc gcg aac ttt gat gaa gcg aaa gcc aaa gcg atc gaa	432
	Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu	
	130 135 140	
10	ctg tca cag cag cag ggg ttc acc tgg gtg ccg ccg ttc gac cat ccg	480
	Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro	
	145 150 155 160	
15	atg gtg att gcc ggg caa ggc acg ctg gcg ctg gaa ctg ctc cag cag	528
	Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln	
	165 170 175	
20	gac gcc cat ctc gac cgc gta ttt gtg cca gtc ggc ggc ggc ggt ctg	576
	Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu	
	180 185 190	
25	gct gct ggc gtg gcg gtg ctg atc aaa caa ctg atg ccg caa atc aaa	624
	Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys	
	195 200 205	
30	gtg atc gcc gta gaa gcg gaa gac tcc gcc tgc ctg aaa gca gcg ctg	672
	Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu	
	210 215 220	
35	gat gcg ggt cat ccg gtt gat ctg ccg cgc gta ggg cta ttt gct gaa	720
	Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu	
	225 230 235 240	
40	ggc gta gcg gta aaa cgc atc ggt gac gaa acc ttc cgt tta tgc cag	768
	Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln	
	245 250 255	
45	gag tat ctc gac gac atc atc acc gtc gat agc gat gcg atc tgt gcg	816
	Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala	
	260 265 270	
50	gcg atg aag gat tta ttc gaa gat gtg cgc gcg gtg gcg aaa ccc tct	864
	Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Lys Pro Ser	
	275 280 285	
55	ggc gcg ctg gcg ctg gcg gga atg aaa aaa tat atc gcc ctg cac aac	912
	Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn	
	290 295 300	
60	att cgc ggc gaa cgg ctg gcg cat att ctt tcc ggt gcc aac gtg aac	960
	Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn	
	305 310 315 320	
65	ttc cac ggc ctg cgc tac gtc tca gaa cgc tgc gaa ctg ggc gaa cag	1008
	Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln	
	325 330 335	
70	cgt gaa gcg ttg ttg gcg gtg acc att ccg gaa gaa aaa ggc agc ttc	1056
	Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe	
	340 345 350	

ctc aaa ttc tgc caa ctg ctt ggc ggg cgt tgc gtc acc gag ttc aac 1104  
 Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn  
 355 360 365

5 tac cgt ttt gcc gat gcc aaa aac gcc tgc atc ttt gtc ggt gtg cgc 1152  
 Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg  
 370 375 380

10 ctg agc cgc ggc ctc gaa gag cgc aaa gaa att ttg cag atg ctc aac 1200  
 Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn  
 385 390 395 400

15 gac ggc ggc tac agc gtg gtt gat ctc tcc gac gac gaa atg gcg aag 1248  
 Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys  
 405 410 415

20 cta cac gtg cgc tat atg gtc ggc gga cgt cca tgc cat ccg ttg cag 1296  
 Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln  
 420 425 430

25 gaa cgc ctc tac agc ttc gaa ttc ccg gaa tca ccg ggc gcg ctg ctg 1344  
 Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu  
 435 440 445

30 cgc ttc ctc aac acg ctg ggt acg tac tgg aac att tct ttg ttc cac 1392  
 Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His  
 450 455 460

35 tat cgc agc cat ggc acc gac tac ggg cgc gta ctg gcg gcg ttc gaa 1440  
 Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu  
 465 470 475 480

40 ctt ggc gac cat gaa ccg gat ttc gaa acc ccg ctg aat gag ctg ggc 1488  
 Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly  
 485 490 495

45 tac gat tgc cac gac gaa acc aat aac ccg gcg ttc agg ttc ttt ttg 1536  
 Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu  
 500 505 510

50 gcg ggt tag 1545  
 Ala Gly

55 <210> 8  
 <211> 514  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

60 <400> 8  
 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr  
 20 25 30  
 Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile  
 35 40 45  
 Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg  
 50 55 60

Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His  
 65 70 75 80

5 Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe  
 85 90 95

Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala  
 100 105 110

10 Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val  
 115 120 125

15 Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu  
 130 135 140

Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro  
 145 150 155 160

20 Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln  
 165 170 175

Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Gly Leu  
 180 185 190

25 Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys  
 195 200 205

30 Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu  
 210 215 220

Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu  
 225 230 235 240

35 Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln  
 245 250 255

40 Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala  
 260 265 270

Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Lys Pro Ser  
 275 280 285

45 Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn  
 290 295 300

Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn  
 305 310 315 320

50 Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln  
 325 330 335

Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe  
 340 345 350

Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn  
 355 360 365

60 Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg  
 370 375 380



Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn  
 385 390 395 400  
 5 Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys  
 405 410 415  
 Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln  
 420 425 430  
 10 Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu  
 435 440 445  
 Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His  
 450 455 460  
 15 Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly  
 485 490 495  
 Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu  
 500 505 510  
 25 Ala Gly  
 <210> 9  
 <211> 1548  
 30 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <220>  
 35 <221> DNA  
 <222> (1)..(1548)  
 <223>  
 40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (527)..(952)  
 <223> yjgF-Orf  
 45 <400> 9  
 tcgcgatctg gtactgtaag gggaaataga gatgacacac gataataaat tgcaggttga 60  
 agctattaaa cgcggcacgg taattgacca tatccccgcc cagatcgggtt ttaagctggt 120  
 50 gagtctgttc aagctgaccg aaacggatca gcgcacacac attggtctga acctgccttc 180  
 tggcgagatg ggccgcaaag atctgatcaa aatcgaaaat acctttttga gtgaagatca 240  
 55 agtagatcaa ctggcattgt atgcgccgca agccacgggt aaccgtatcg acaactatga 300  
 agtgggtgggt aaatcgccgc caagtctgcc ggagcgcacg gacaatgtgc tggctctgcc 360  
 gaacagcaac tgtatcagcc atgccgaacc ggtttcatcc agcttttgccg tgcgaaaacg 420  
 60 cgccaatgat atcgcgctca aatgcaaata ctgtgaaaaa gagttttccc ataattgtgg 480

	gctggccaat taattgCGgt tggtaataaaa agtctggctc cctata atg agc cag	535
	Met Ser Gln	
	1	
5	act ttt tac cgc tgt aat aaa gga gaa atc atg agc aaa act atc gcg	583
	Thr Phe Tyr Arg Cys Asn Lys Gly Glu Ile Met Ser Lys Thr Ile Ala	
	5 10 15	
10	acg gaa aat gca ccg gca gct atc ggt cct tac gta cag ggc gtt gat	631
	Thr Glu Asn Ala Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Val Gln Gly Val Asp	
	20 25 30 35	
15	ctg ggc aat atg atc atc acc tcc ggt cag atc ccg gta aat ccg aaa	679
	Leu Gly Asn Met Ile Ile Thr Ser Gly Gln Ile Pro Val Asn Pro Lys	
	40 45 50	
	acg ggc gaa gta ccg gca gac gtc gct gca cag gca cgt cag tgc ctg	727
	Thr Gly Glu Val Pro Ala Asp Val Ala Ala Gln Ala Arg Gln Ser Leu	
	55 60 65	
20	gat aac gta aaa gcg atc gtc gaa gcc gct ggc ctg aaa gtg ggc gac	775
	Asp Asn Val Lys Ala Ile Val Glu Ala Ala Gly Leu Lys Val Gly Asp	
	70 75 80	
25	atc gtt aaa act acc gtg ttt gta aaa gat ctg aac gac ttc gca acc	823
	Ile Val Lys Thr Thr Val Phe Val Lys Asp Leu Asn Asp Phe Ala Thr	
	85 90 95	
30	gta aac gcc act tac gaa gcc ttc ttc acc gaa cac aac gcc acc ttc	871
	Val Asn Ala Thr Tyr Glu Ala Phe Phe Thr Glu His Asn Ala Thr Phe	
	100 105 110 115	
35	ccg gca cgt tct tgc gtt gaa gtt gcc cgt ctg ccg aaa gac gtg aag	919
	Pro Ala Arg Ser Cys Val Glu Val Ala Arg Leu Pro Lys Asp Val Lys	
	120 125 130	
40	att gag atc gaa gcg atc gct gtt cgt cgc taa tcttgatgga aatccgggct	972
	Ile Glu Ile Glu Ala Ile Ala Val Arg	
	135 140	
45	atcatgcccg gattaagtct gatgacaaac gcaaaatcgc ctgatgcgct acgcttatca	1032
	ggcctacgtg attcctgcaa tttattgaat ttgttgccg gataaggcat ttacgccgca	1092
	tccggcatga acaaaaactca ctttgtctac aatctgaatc ggggctatcg tgcccagttt	1152
	attctttatt gccagccgta acgacggcta tagaaccctt tcaccaactg ggtaaatgtc	1212
50	atataccctg ccagaatcgc aaccagccac gggaaatagc ttaacggcag cgcctgtaat	1272
	tgcagataac tggccagcgg tgaaaacggc aatgcgatcc cgacaatcat cacgatcacg	1332
	gtcatgatca ttaacggcca cgatgcacag ctctgaataa acggcacacg gcgggtgcgg	1392
55	atcatatgca caatcagcgt ttgcgacagt aagcccacca caaaccatcc cgactggaac	1452
	agcgtttgcg tttccggcgt gttggcatgg aatacccacc acatcaggca aaacgtcaaa	1512
60	atatcgaaga tcgagctgat cgggccgaag aagatc	1548

15

<210> 10  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

5

<400> 10  
 Met Ser Gln Thr Phe Tyr Arg Cys Asn Lys Gly Glu Ile Met Ser Lys  
 1 5 10 15

10

Thr Ile Ala Thr Glu Asn Ala Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Val Gln  
 20 25 30

15

Gly Val Asp Leu Gly Asn Met Ile Ile Thr Ser Gly Gln Ile Pro Val  
 35 40 45

Asn Pro Lys Thr Gly Glu Val Pro Ala Asp Val Ala Ala Gln Ala Arg  
 50 55 60

20

Gln Ser Leu Asp Asn Val Lys Ala Ile Val Glu Ala Ala Gly Leu Lys  
 65 70 75 80

Val Gly Asp Ile Val Lys Thr Thr Val Phe Val Lys Asp Leu Asn Asp  
 85 90 95

25

Phe Ala Thr Val Asn Ala Thr Tyr Glu Ala Phe Phe Thr Glu His Asn  
 100 105 110

30

Ala Thr Phe Pro Ala Arg Ser Cys Val Glu Val Ala Arg Leu Pro Lys  
 115 120 125

Asp Val Lys Ile Glu Ile Glu Ala Ile Ala Val Arg Arg  
 130 135 140